مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۵۸/هفته دوم دی ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۶/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۸/۲۴

بررسی اثرات ایمونوشیمی درمانی مادهی اپیژنین بر سرطان سینه در موشهای مادهی نژاد Balb/c

دکتر رضا رنجبر[۱]، میلاد دولتخواه[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: از میان روشهای مختلف درمان سرطان، روشی که بیشترین سمیت بر سلولهای مبتلا به سرطان و کمترین اثر جانبی بر سلولهای سالم فرد بیمار را داشته باشد، بیشتر مورد استفاده قرار میگیرد. فلاونوئیدها ترکیباتی پلیفنولیک هستند که به علت اثرات بیوشیمیایی و درمانی بر سلولهای مبتلا به سرطان، مورد توجه دانشمندان هستند. این تحقیق، با هدف بررسی اثرات ایمنومدولاتوری نوعی فلاونوئید به نام اپیژنین در ایمنی ضد تومور و مهار رشد بافت تومور مورد انجام شد.

روشها: این مطالعه بر روی موشهای مبتلا به تومور Balb/c در طیف سنی ۸-۶ هفته، انجام گرفت. ابتدا دوز مؤثر اپیژنین با آزمایش ازدیاد حساسیت تأخیری (Delayed-typed hypersensitivity یا DTH) به دست آمد. سپس با روش پیوند بافت، تومور سرطان سینه القا و پس از ۱۲ روز تیمار، میزان تکثیر لنفوسیتهای طحال و الگوی سایتوکاینی آنها با اندازهگیری میزان IL-4 (Interleukin-4) و IFN-γ (Interferon gamma) اندازهگیری شد.

یافتهها: اپیژنین باعث افزایش پاسخ ازدیاد حساسیت تأخیری ($P < ۰/۰۵$)، کاهش حجم تومور ($P < ۰/۰۵$)، افزایش سطح IFN-γ ($P < ۰/۰۵$) و کاهش سطح IL-4 ($P < ۰/۰۵$) شد. همچنین، تکثیر لنفوسیتها در حیوانهای مبتلا به سرطان درمان شده با اپیژنین، در مقایسه با گروه شاهد به طور معنیداری افزایش یافت ($P < ۰/۰۵$).

نتیجهگیری: اپیژنین میتواند باعث افزایش پاسخ ازدیاد حساسیت تأخیری در حیوانهای مادهی نژاد Balb/c و کاهش رشد تومور سرطان سینه در حیوانهای مبتلا به تومور شود و نسبت سایتوکاینی را در آنهابه نفع IFN-γ تغییر دهد. افزایش IFN-γ و کاهش IL-4 در حیوانهای مبتلا به تومور درمان شده با اپیژنین، نشان میدهد که اپیژنین باعث تغییر جهت سیستم ایمنی حیوان به سمت Th1 (T helper-1) و ایمنی سلولی شده است. با توجه به این موضوع، میتوان انتظار داشت که اپیژنین داروی مناسبی برای درمان سرطان باشد.

واژگان کلیدی: اپیژنین، سرطان سینه، Interferon gamma، Interleukin-4

ارجاع: رنجبر رضا، دولتخواه میلاد. **بررسی اثرات ایمونوشیمی درمانی مادهی اپیژنین بر سرطان سینه در موشهای مادهی نژاد Balb/c.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۵۸): ۱۸۹۷-۱۸۹۱

مقدمه

سرطان پستان، شایع ترین سرطان در زنان و اولین علت مرگ ناشی از سرطان در زنان ۴۴-۴۰ ساله است. هر ساله تعداد زیادی از مبتلایان به سرطان سینه تشخیص داده میشوند و تعدادی نیز جان خود را از دست میدهند (۱).

یکی از روشهای درمان سرطان، شیمیدرمانی است. شیمیدرمانی به دو صورت مونوتراپی و ترکیبی انجام میشود که فرم ترکیبی اثرات مفیدتری در موارد متاستاتیک دارد. شیمیدرمانی، متاستاز را به تأخیر می اندازد و گاهی افزایش بقا را سبب میشود. مکانیسم عمل داروهای شیمیدرمانی، کشتن سلولهای در حال تقسیم و یا مهار تقسیم سلولی آنها است، اما داروهای شیمیدرمانی قادر به تشخیص سلولهای سالم از سلولهای مبتلا به سرطان نیستند و بر سلولهای طبیعی در حال تقسیم نیز اثرات مضر شدیدی اعمال میکنند؛ از جملهی این اثرات، میتوان به ریزش موی بیماران مبتلا

۱- استاد، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله (عج)، تهران، ایران
۲- دانشجوی دکتری، گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، پژوهشکدهی سیستم بیولوژی، پژوهشگاه علوم پزشکی بقیهاله (عج)، تهران، ایران
نویسندهی مسؤول: میلاد دولتخواه
Email: milad.dolatkhah@yahoo.com

به سرطان در حال شیمی‌درمانی، عوارض مخرب آن بر بدن بیماران و بروز افسردگی اشاره کرد (۲).

با توجه به محدودیت‌های روش‌های رایج درمان سرطان، امروزه درمان سرطان به کمک روش‌های ایمونولوژیک بیشتر مورد توجه قرار گرفته است و شناخت مکانیسم‌های مقاومت بدن و یافتن موادی که منجر به تقویت سیستم دفاعی طبیعی بدن شوند، یکی از راهکارهای نوین درمانی می باشد. به همین دلیل، علم پزشکی نوین به سمت و سویی سوق پیدا کرده است که در آن برای درمان سرطان از موادی به عنوان دارو استفاده شود که سیستم ایمنی خود میزبان را تقویت کند و دارو بتواند به طور اختصاصی سلول‌های مبتلا به سرطان را از بین ببرد و تأثیری بر سلول‌های سالم فرد بیمار نداشته باشد. این روش ایمنوشیمی‌درمانی نام دارد (۳).

فلاونوئیدها گروهی از ترکیبات پلی‌فنولیک هستند که به طور وسیعی در شاخه‌ی گیاهان وجود دارند (۴). بسیاری از آن‌ها اثرات سمی کمی بر سلول‌های پستانداران دارند و بعضی هم به طور گسترده ای در پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۵). فلاونوئیدها، اثرات بیولوژیک متنوعی از خود بروز می‌دهند که شامل خواص ضدالتهابی، ضد سمیت سلول های کبدی و ضد زخم معده می‌باشد (۶). آن‌ها همچنین آنزیم هایی از قبیل آلدوز ردوکتاز و گزانتین اکسیداز را مهار می‌کنند. فلاونوئیدها آنتی‌اکسیدان‌های قوی هستند و توانایی بالایی در زدودن رادیکال‌های آزاد دارند. بسیاری هم خواص ضد آلرژی، ضد ویروسی و کاهش خطر بیماری‌های قلبی- عروقی دارند (۷). فلاونوئیدها نشان داده‌اند که در مهار رشد رده‌های مختلفی از سلول‌های مبتلا به سرطان توانمند هستند و باعث کاهش رشد تومور در محیط‌های In vitro و In vivo می‌شوند (۸).

یکی از اثرات مهم بیولوژیک فلاونوئیدها، جلوگیری از رشد سلول‌های مبتلا به سرطان و ممانعت از ازدیاد و تقسیم این سلول‌ها است؛ در حالی که هیچ اثری بر سلول‌های طبیعی ندارند. با توجه به مطالب پیش گفته و تحقیقاتی که در سال‌های اخیر بر روی اثرات ضدسرطانی گروهی از مواد به نام فلاونوئید انجام شده است، پژوهش حاضر با هدف بررسی اثرات ایمنوشیمی درمانی نوعی فلاونوئید به نام اپیژنین، بر تومور و به ویژه ایمنی ضد تومور آن انجام شد.

روش‌ها

این پژوهش یک مطالعه‌ی بنیادی کاربردی بود که بر روی موش‌های ماده‌ی نژاد Balb/c ۸-۶ هفته‌ای Inbred انجام گرفت. برای بررسی اثر اپیژنین بر پاسخ ایمنی سلولی موش‌ها، از آزمایش ازدیاد حساسیت تأخیری (DTH یا Delay type hypersensitivity) استفاده شد. ۲۰ عدد موش ماده‌ی سالم تهیه و به صورت تصادفی به چهار گروه پنج‌تایی تقسیم شدند. دوره‌ی تزریق، به این ترتیب انجام شد: در روز صفر، به ۳ گروه مورد مطالعه، دوزهای ۳/۶۵، ۵/۸۵ و ۹/۶۸ میکروگرم به ازای هر موش (µg/mouse/day) اپیژنین تزریق شد. به گروه دیگر، بافر فسفات سالین که برای تهیه‌ی رقت‌های مختلف از اپیژنین به کار رفته بود، به عنوان شاهد تزریق شد. نحوه‌ی تزریق به صورت داخل صفاقی (Intra peritoneal) و در حجم ۰/۱ ml بود. سپس در همان روز، به تمام موش‌ها $10^8 \times 1$ از SRBC (Sheep red blood cells) (شسته شده با Phosphate-buffered saline یا PBS) در حجم ۰/۱ ml به صورت زیر پوستی در پشت حیوانات تزریق شد. سپس به مدت ۵ روز تزریق اپیژنین در یک زمان مشخص ادامه یافت. در روز پنجم تزریق، بار دیگر $10^8 \times 1$ از SRBC در کف پای عقب سمت چپ موش‌ها انجام شد. سپس، در مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تزریق دوم SRBC، ضخامت پای تزریق شده و تزریق نشده توسط کولیس ورنیه‌ی دیجیتال اندازه‌گیری شد و درصد افزایش ضخامت کف پا از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\frac{(\text{left footpad challenged with SRBC} - \text{right footpad}) \times 100}{\text{right footpad}}$$

روش مبتلا کردن موش ها به تومور: موش ماده‌ی نژاد Balb/c مبتلا به سرطان سینه (Invasive ductal carcinoma)، با رعایت موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی کشته شد. سپس، بافت مبتلا به تومور از بدن حیوان خارج و در داخل پلیت حاوی PBS استریل سرد قرار گرفت. بافت چربی، بافت نکروز و رگ‌های خونی جدا و به قطعات کوچک‌تر تقسیم شد. نمونه‌ای از بافت مبتلا به تومور برای تأیید سرطان سینه به آزمایشگاه فرستاده شد. موش‌های Balb/c ماده و سالم ۸-۶ هفته‌ای (انستیتو پاستور، ایران) با تزریق داخل صفاقی ماده‌ی بیهوشی (کتامین + زایلازین) بیهوش شدند. پس از تمیز کردن پشت و پهلوی موش‌ها با الکل ۷۰ درصد، قطعاتی در حدود ۶۲/۵ mm^3 به صورت زیر پوستی پیوند زده شد و لبه‌های پوست با استفاده از کلیپس به هم بخیه شدند.

نحوه‌ی تیمار موش های مبتلا به تومور شده: پس از گذشت حدود ۱۰ روز تومور در ناحیه‌ی پیوندی ظاهر گردید. در این زمان، تومورها آماده ی تیمار بودند. بر اساس نتایج حاصل از آزمون DTH، میزان دوزی که بیشترین اثر را بر سیستم ایمنی می‌گذارد، انتخاب شد. تعداد ۱۵ سر موش Balb/c ماده‌ی مبتلا به تومور به صورت تصادفی در ۳ گروه پنج‌تایی قرار گرفتند و دوره ی تزریق را سپری کردند. به گروه مورد، ۰/۱ ml اپیژنین از دوز ۹/۶۸ µg/mouse/day به صورت داخل صفاقی تزریق شد. به گروه شاهد مثبت، مقدار ۰/۱ ml سیکلوفسفامید که یک داروی تأیید شده‌ی ضد سرطان است، از دوز ۲۰ µg/mouse/day به صورت داخل صفاقی تزریق شد و به گروه

شاهد منفی، مقدار ۰/۱ ml بافر PBS به طور مشابه تا روز دوازدهم تزریق شد. تزریق ها هر روز در یک زمان و توسط یک شخص انجام می‌گرفت. تزریق اپیژنین به مدت ۱۲ روز متوالی انجام شد و حجم تومور هر روز با استفاده از کولیس ورنیه‌ی دیجیتال (Mitutoyo, Japan) طبق فرمول زیر اندازه‌گیری شد: $V = 1/2\ LW^2$ (V بیان کننده‌ی حجم، L طول و W عرض).

بعد از ۱۲ روز تزریق، موش‌ها با رعایت موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی کشته شدند و لنفوسیت‌های طحال آن‌ها تحت شرایط استریل جدا شدند. لنفوسیت‌های طحالی جدا شده از هر موش، پس از شمارش به منظور کشت، سوسپانسیون سلولی حاوی تعداد 2×10^6 سلول در محیط کشت RPMI1640 (Roswell Park Memorial Institute1640) (Gibco, UK) در هر چاهک میکرو پلیت ۲۴ خانه ای ریخته (هر نمونه سه چاهک) و برای تحریک سلول‌ها به هر چاهک ۲۰ µl آنتی‌ژن تومور اضافه شد. حجم نهایی هر چاهک با ۱۰ درصد FBS RPMI1640- (Roswell Park Memorial Institute1640- fetal bovine serum) به ۱۰۰۰ µl رسانده شد و به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور انکوبه گردید. پس از این مدت، میکروپلیت سانتریفیوژ و مایع رویی حاصل از کشت سلول‌ها جمع‌آوری شد. برای بررسی میزان تولید سایتوکاین‌های IL-4 (Interleukin-4) و IFN-γ (Interferon gamma) از آزمون ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) (DuoSet R&D, USA) استفاده شد. سپس، برای تعیین میزان تکثیر لنفوسیت‌های طحالی از آزمون MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Roche, Germany) استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه‌ی ۱۹ (version 19, SPSS Inc., Chicago, IL) و با استفاده از آزمون‌های One way ANOVA و Independent-samples t انجام شد. حدود اطمینان ۹۵ درصد بود و $P < ۰/۰۵۰$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از اثر ماده‌ی اپیژنین بر پاسخ ازدیاد حساسیت تأخیری در موش‌های سالم در جدول ۱ آمده است. درصد افزایش قطر پا پس از گذشت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری متفاوت بود ($P < ۰/۰۵$).

نتایج حاصل از ۱۲ روز تزریق ماده‌ی اپیژنین بر حجم تومور در حیوان‌های مبتلا به سرطان سینه در شکل ۱ آمده است. ملاحظه می‌شود که رشد تومور در حیوان‌های درمان شده با اپیژنین، به طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود ($P < ۰/۰۵$).

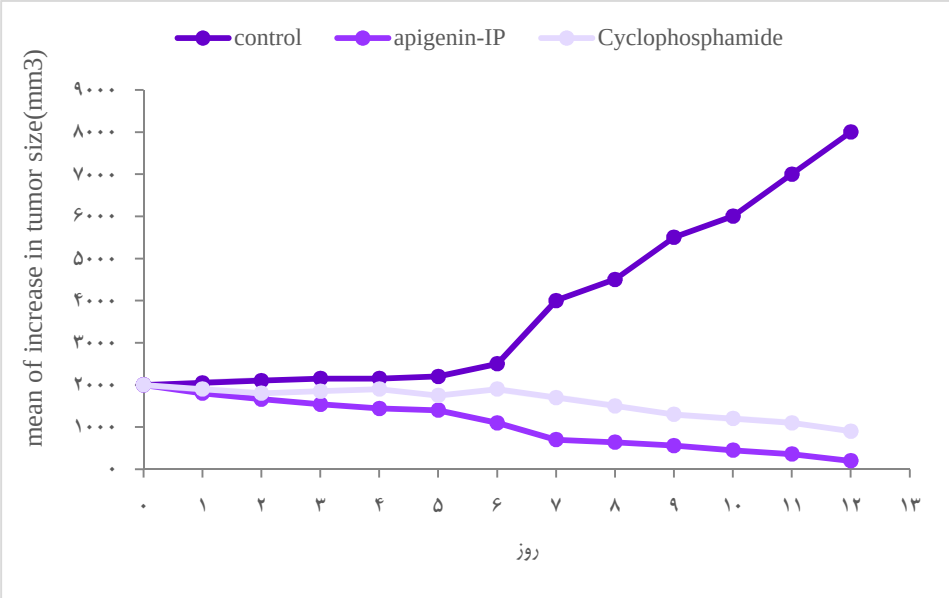
نتایج حاصل از آزمون MTT که از تحریک اختصاصی لنفوسیت‌های طحالی به وسیله ی آنتی‌ژن تومور انجام شده بود، به صورت شاخص تحریک تکثیر سلولی در شکل ۲ آمده است. همان طور که مشهود است، بررسی شاخص تحریک اختصاصی لنفوسیت‌های طحالی نشان می‌دهد که پرولیفراسیون سلول‌های طحالی که با اپیژنین درمان شده‌اند، به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافته است ($P < ۰/۰۵$).

نتایج حاصل از اثر ماده‌ی اپیژنین بر الگوی سایتوکاینی لنفوسیت‌های طحالی در شکل ۳ آمده است. سطح IFN-γ به طور معنی‌داری در حیوان‌های درمان شده با اپیژنین، در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافته است ($P < ۰/۰۵$)، در حالی که سطح IL-4 به طور معنی‌داری کاهش یافته است ($P < ۰/۰۵$).

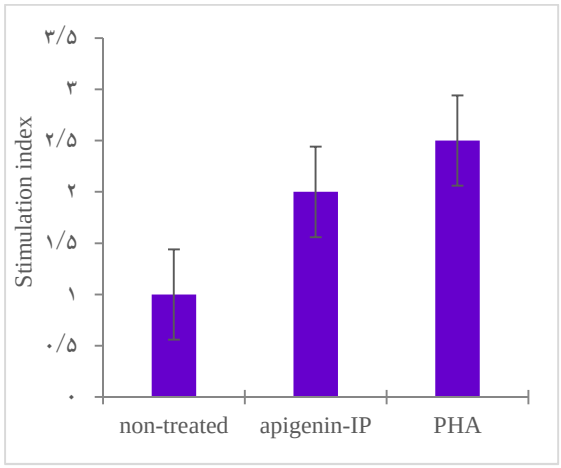
جدول ۱. اثر اپیژنین بر میانگین درصد افزایش قطر کف پا (DTH یا Delay type hypersensitivity) در موش‌های ماده‌ی نژاد Balb/c

گروه	درصد افزایش قطر پا میانگین ± انحراف معیار		
	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
گروه ۱ SRBC + saline	۲۸/۰ ± ۴/۲	۳۰/۰ ± ۷/۲	۳۲/۰ ± ۹/۸
گروه ۲ SRBC + apigenin (3.65µg/mouse/day)	۳۶/۰ ± ۷/۹*	۴۱/۰ ± ۸/۸*	۴۲/۰ ± ۶/۳*
گروه ۳ SRBC + apigenin (5.85µg/mouse/day)	۵۴/۰ ± ۷/۷*	۵۳/۰ ± ۵/۴*	۵۹/۰ ± ۴/۳*
گروه ۴ SRBC + apigenin (9.68µg/mouse/day)	۵۴/۰ ± ۵/۴*	۵۴/۰ ± ۵/۴*	۷۱/۰ ± ۶/۳*

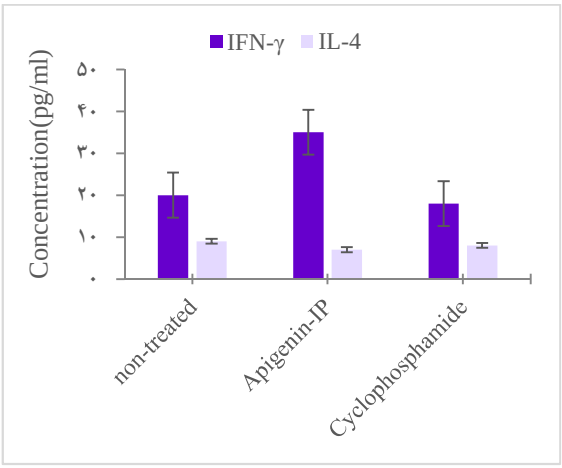
* $P < ۰/۰۵$



شکل ۱. افزایش میانگین حجم تومور (میانگین ± انحراف معیار) در گروه‌های شاهد منفی (تزریق PBS یا Phosphate buffered saline)، شاهد مثبت (تزریق سیکلوفسفامید) و گروه مورد (تزریق اپیژنین). رشد تومور در موش‌هایی که اپیژنین دریافت کرده‌اند، به طور معنی‌داری کمتر از گروه‌های شاهد است (P < ۰/۰۵) که بیانگر اختلافی معنی‌دار در مقایسه با گروه شاهد می‌باشد.



شکل ۲. نمودار شاخص تحریک لنفوسیت‌های طحالی (پنج موش در هر گروه). گروه اول لنفوسیت‌هایی هستند که تحت هیچ درمانی نبوده‌اند، گروه دوم لنفوسیت‌هایی هستند که با آنتی‌ژن تومور تحریک شده‌اند و گروه سوم لنفوسیت‌هایی هستند که میتوژن PHA به آن‌ها اضافه شده بود. سنجش پرولیفراسیون لنفوسیت‌ها با استفاده از آزمون MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) انجام گرفت. نتایج نشان می‌دهد که لنفوسیت‌های موش‌هایی که با اپیژنین درمان شده بودند، در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری افزایش پرولیفراسیون داشته‌اند (P < ۰/۰۵). نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده است.



شکل ۳. نمودار میانگین ± انحراف معیار سایتوکاین‌های IFN-γ (Interferon gamma) و IL-4 (Interleukin-4) ترشح شده از لنفوسیت‌های طحالی. لنفوسیت‌های طحالی پس از ۱۲ روز تزریق داخل صفاقی اپیژنین، استخراج و کشت داده شدند و به وسیله‌ی آنتی‌ژن توموری تحریک شدند. مقدار سایتوکاین‌های IFN-γ و IL-4 با استفاده از آزمون ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) اندازه‌گیری شد. در هر گروه ۵ موش مبتلا به تومور وجود داشت. سطح IFN-γ به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد افزایش داشت (P < ۰/۰۵۰)؛ در حالی که سطح IL-4 به طور معنی‌داری کاهش نشان داد (P < ۰/۰۵).

بحث

اپیژنین نوعی فلاونوئید است که به طور وسیعی در گیاهان وجود دارد. فلاونوئیدها اثرات بیولوژیک متنوعی از خود بروز می‌دهند که یکی از آن‌ها خواص آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. فلاونوئیدها با داشتن گروه‌های عامل مهمی مانند گروه 5-OH در حلقه‌ی A و گروه 4'-OMe در حلقه‌ی B و عامل ۴-کربونیل در حلقه‌ی C، باعث خنثی کردن رادیکال‌های آزاد و احیای اکسیدان‌ها می‌شوند (۹). التهاب مزمن زمینه را برای بروز سرطان مهیا می‌کند. سلول‌ها و میانجی‌های التهابی سیستم ایمنی در افراد مبتلا به سرطان افزایش می‌یابد. از دیگر خواص فلاونوئیدها، خاصیت ضد التهابی آن‌ها است. فلاونوئیدها با مهار فعالیت آنزیم‌هایی مانند فسفولیپاز-A_2، سیکلواکسیژناز، لیپواکسیژناز و نیتریک اکسید سنتاز باعث کاهش التهاب در بدن می‌شوند (۱۰). خاصیت ضد سرطانی فلاونوئیدها علیه انواع مختلفی از سلول‌های مبتلا به سرطان به اثبات رسیده است. فلاونوئیدها با القای آپوپتوز و همچنین توقف چرخه‌ی سلولی در سلول‌های مبتلا به سرطان باعث مرگ سلول‌ها و همچنین مهار تقسیم سلولی در آن‌ها می‌شوند (۱۱).

از سوی دیگر، هدف عمده‌ی دانشمندان علم سرطان‌شناسی ساخت داروهایی است که به طور هدفمند و اختصاصی، تنها سلول‌های مبتلا به تومور را مورد هدف قرار بدهد و به سلول‌های سالم آسیب نرساند. این هدف به طور عمده از طریق جراحی انجام می‌گیرد، اما در اغلب موارد وجود متاستاز، موفقیت این روش را محدود می‌کند؛ امروزه رویکرد جدید به سمت شیمی درمانی معطوف شده است (۱۲).

شیمی‌درمانی اغلب به صورت غیر اختصاصی سلول‌های در حال تقسیم را می‌کشد که این عمل، گاهی سمیت قابل توجهی را متوجه سلول‌های سالم در حال تقسیم می‌کند (۱۳)؛ بنا بر این، اگر بتوان روشی را به کار گرفت که هم واجد خصوصیات شیمی درمانی باشد و هم به نحوی اختصاصی عمل کند و از طرف دیگر سیستم ایمنی را تقویت کند (۱۴)، می‌توان این روش را به عنوان یک روش مطلوب ضد سرطان معرفی کرد.

آزمون ایمنی سلولی جهت بررسی اثر اپیژنین بر افزایش پاسخ‌دهی سلول‌های T طراحی شده است. مجموعه‌ی لنفوسیت‌های حساس شده‌ای که موجب ازدیاد حساسیت تأخیری می‌شوند، چنان که با آنتی‌ژن مربوط مواجه شوند، انواع مختلفی از مواد مؤثر را ترشح می‌کنند که با نام لنفوکاین شناخته می‌شوند. این لنفوکاین‌ها دارای خواصی از جمله کشتن سلول‌های هسته‌دار هدف، جلب سایر لنفوسیت‌ها (کموتاکسی)، تقویت فعالیت ماکروفاژها و فاگوسیتوز، ممانعت از مهاجرت ماکروفاژها، تغییر شکل بلاستیک لنفوسیت‌ها، جلب نوتروفیل‌ها و واکنش‌های التهابی پوست می‌باشند. این واکنش‌ها به صورت تورم و سفتی پوستی ظاهر می‌شوند. مدت زمانی که این واکنش‌ها به حداکثر خود می‌رسد، به طور معمول ۷۲-۲۴ ساعت است (۱۵).

طبق نتایج مشاهده شده و موارد پیش‌گفته، دوز تحریک کننده‌ی سلولی، دوزی از اپیژنین است که میزان پاسخ‌دهی سلول‌های T کمکی را بهبود بخشد و پاسخ‌های شدیدتر تورم در کف پای موش حساس شده ایجاد کند. دوز ۹/۶۸ µg/mouse/day دارای چنین خصوصیتی بود. این دوز در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بیشترین اختلاف معنی‌دار را با سایر گروه‌ها داشت.

اثر اپیژنین بر رشد تومور: در طول دوره‌ی درمان، رشد تومور در گروه‌های مختلف اندازه‌گیری و مورد مقایسه قرار گرفت. تفاوت معنی‌دار از روز ۶ بین گروه درمان شده با اپیژنین و گروه‌های شاهد مشاهده شد. در این تحقیق، اپیژنین رشد تومور را به صورت معنی‌داری مهار کرد.

اثر اپیژنین بر تکثیر لنفوسیتی: لنفوسیت‌های حساس شده در مواجهه با آنتی‌ژن مربوط تکثیر می‌شوند و اثرات خود را اعمال می‌کنند. تکثیر لنفوسیت‌ها از اولین نشانه‌های فعال شدن توسط آنتی‌ژن است. این بررسی توسط روش متداول MTT انجام گرفت. میزان تکثیر در گروه‌های تحت درمان نسبت به گروه شاهد افزایش داشت و از نظر آماری به سطح معنی‌داری رسید.

اثر اپیژنین بر تولید سایتوکاین: سایتوکاین‌ها نقش مهمی در سیستم ایمنی دارند، ابزار ارتباطی سلول‌ها به شمار می‌آیند و روند و جهت پاسخ‌های ایمنی معین را تعیین می‌کنند. بر این اساس، پاسخ‌های سایتوکاینی سیستم ایمنی را به انواع I و II تقسیم‌بندی کرده‌اند. پاسخ‌های محافظتی به خصوص علیه سرطان، در حیطه‌ی پاسخ‌های نوع I طبقه‌بندی می‌شوند. از خصوصیات پاسخ‌های نوع I، می‌توان تولید IFN-γ را نام برد که برای فعال شدن بسیاری از مکانیسم‌های دفاعی، از سلول‌های Th1 فعال شده ترشح می‌شود و مشخصه‌ی بهبود پاسخ‌های ایمنی علیه تومور به حساب می‌آید (۱۶).

مکانیسم‌های فرار تومور سبب کاهش پاسخ‌های Th1 و بنا بر این کاهش تولید IFN-γ و افزایش تولید IL-4 می‌شوند. از این رو، پاسخ‌های محافظتی سرکوب می‌شوند. تقویت پاسخ‌های سلولی Th1 به بهبود روند درمان در افراد مبتلا به سرطان کمک می‌کند و میزان پیش‌آگهی را بهبود می‌بخشد (۱۷).

در این مطالعه، تیمار با اپیژنین سبب افزایش تولید IFN-γ گردید و از نظر آماری معنی‌دار بود و در مقابل، میزان IL-4 کاهش معنی‌دار داشت. در مورد شیفت پاسخ‌های سایتوکاینی نشان داده شد که اپیژنین سبب شیفت پاسخ‌ها به سمت Th1 می‌شود.

به طور کلی، درمان‌های ضد تومور از دو طریق غیر مستقیم و مستقیم می‌توانند بر روی سیستم ایمنی تأثیر بگذارد. برای تأثیر غیرمستقیم داروهای ضد تومور بر سیستم ایمنی، دو مکانیسم در نظر گرفته می‌شود؛ اول این که شیمی‌درمانی با کاهش حجم تومور سبب کاهش خواص سرکوب کنندگی آن و در نتیجه، کاهش مهار سیستم ایمنی توسط تومور می‌شود. دوم این که شیمی‌درمانی می‌تواند با القای بیان آنتی‌ژن‌های توموری جدید، سبب تحریک سیستم ایمنی گردد. از طرف دیگر، شیمی‌درمانی ممکن است به طور مستقیم روی عوامل کارگزار و تنظیم کننده‌ی سیستم ایمنی تأثیر داشته باشد و یا با ایجاد لنفوپنی، سبب تکثیر هوموستاتیک عوامل کارگزار سیستم ایمنی گردد (۱۸).

مطالعه‌ی حاضر که برای اولین بار در ایران خواص ضد توموری و ضد سرطانی اپیژنین را مورد بررسی قرار داده است، نشان می‌دهد که اپیژنین در کشتن سلول‌های مبتلا به تومور نسبت به سیکلوفسفامید موفق‌تر عمل می‌کند و همچنین، دارای اثرات ایمنومدولاتوری قوی‌تری است. در انتها، نتیجه‌گیری می‌شود که اپیژنین با داشتن ویژگی‌هایی چون سمیت اختصاصی علیه سلول‌های مبتلا به تومور، عوارض جانبی کم، قیمت پایین و همچنین قابلیت شیفت به Th1، این پتانسیل را دارد که به عنوان داروی ایمنوشیمی‌درمانی برای بیماران مبتلا به سرطان انتخاب شود. البته مطالعات بیشتری جهت روشن ساختن مکانیسم اثرات مشاهده شده و دیگر شاخص‌های ایمونولوژیکی لازم است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با همکاری مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج) صورت گرفت. بدین وسیله از کارکنان آزمایشگاه بیولوژی مولکولی که زمینه‌ی اجرای این تحقیق را فراهم آوردند، سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Kamatou GPP, van Zyl RL, Davids H, van Heerden FR, Lourens ACU, Viljoen AM. Antimalarial and anticancer activities of selected South African Salvia species and isolated compounds from S. radula. South African Journal of Botany 2008; 74(2): 238-43.
2. Tezuka Y, Stampoulis P, Banskota AH, Awale S, Tran KQ, Saiki I, et al. Constituents of the Vietnamese medicinal plant Orthosiphon stamineus. Chem Pharm Bull (Tokyo) 2000; 48(11): 1711-9.
3. Gohari AR, Saeidnia S, Malmir M, Hadjiakhoondi A, Ajani Y. Flavones and rosmarinic acid from Salvia limbata. Nat Prod Res 2010; 24(20): 1902-6.
4. Peterson J, Dwyer J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. Nutrition Research 1998; 18(12): 1995-2018.
5. Rajnarayana K, Reddy MS, Chaluvadi MR, Krishna DR. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. Indian J Pharmacol 2001; 33(1): 2-16.
6. Markham KM. Flavones, Flavonols and their Glycosidcs. In: Harborne JB, editor. Methods in plant biochemistry. New York, NY: Academic Press; 2012. p. 197.
7. Andersen OM, Markham KR. Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications. Boca Raton, FL: CRC Press; 2010.
8. Agrawal AD. Pharmacological activities of flavonoids: A review. Int J Pharm Sci Nanotech 2011; 4(2): 1394-8.
9. Krueger RJ. Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications. Economic Botany 2007; 61(1): 101.
10. Cook NC, Samman S. Flavonoids□Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. J Nutr Biochem 1996; 7(2): 66-76.
11. Pauff JM, Hille R. Inhibition studies of bovine xanthine oxidase by luteolin, silibinin, quercetin, and curcumin. J Nat Prod 2009; 72(4): 725-31.
12. Grotewold E. The science of flavonoids. New York, NY: Springer; 2006.
13. Fox JG, Wang TC. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. J Clin Invest 2007; 117(1): 60-9.
14. Prabhala RH, Neri P, Bae JE, Tassone P, Shammas MA, Allam CK, et al. Dysfunctional T regulatory cells in multiple myeloma. Blood 2006; 107(1): 301-4.
15. Quach H, Ritchie D, Stewart AK, Neeson P, Harrison S, Smyth MJ, et al. Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDS) in multiple myeloma. Leukemia 2010; 24(1): 22-32.
16. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Andre F, Tesniere A, Kroemer G. The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? J Clin Invest 2008; 118(6): 1991-2001.
17. Firestone GL, Sundar SN. Anticancer activities of artemisinin and its bioactive derivatives. Expert Rev Mol Med 2009; 11: e32.
18. Zitvogel L, Kroemer G. Anticancer immunochemotherapy using adjuvants with direct cytotoxic effects. J Clin Invest 2009; 119(8): 2127-30.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 20.09.2015
Vol. 33, No. 358, 2nd Week, January 2016
Accepted: 15.11.2015

Evaluation of Immunochemotherapy Effects of Apigenin in Female Balb/c Mice with Breast Cancer

Reza Ranjbar PhD, Milad Dolatkhah MSc[2]

Original Article

Abstract

Background: Among the various methods of cancer treatment, the method is more considered which has the most toxicity on the cancerous cells and the minimal side effects on patients' healthy cells. Flavonoids are polyphenolic compounds which due to their biochemical and therapeutic effects have attracted scientists' attention. This study aimed to investigate the immunomodulatory effects of apigenin as a flavonoid in anti-tumor immunity and tumor-growth inhibition.

Methods: This study was carried out on Balb/c tumor-bearing mice, aged from six to eight weeks. First, the optimized dose of apigenin was determined through delayed-typed hypersensitivity (DTH) test. Then, breast cancer tumor were induced through tissue transplant method and after 12 days of treatment, their spleen lymphocyte proliferation and spleen lymphocyte cytokine production were assessed via measuring the amounts of interleukin-4 (IL-4) and gamma interferon (IFN-γ).

Findings: Apigenin caused an increased delayed-typed hypersensitivity ($P < 0.05$), decreased tumor volume ($P < 0.05$), increased the IFN-γ level ($P < 0.05$) and decreased the IL-4 level ($P < 0.05$). As well as the lymphocyte proliferation in apigenin-treated mice increased significantly in comparison to the control group ($P < 0.05$).

Conclusion: Apigenin can cause an increased delayed-typed hypersensitivity in Balb/c female mice and decreased tumor-growth in tumor-bearing mice and can alter the cytokine ratio to IFN-γ. Increase of IFN-γ and decrease of IL-4 in apigenin-treated mice show that apigenin can switch the mouse immune system towards Th1 and cell-mediated immune responses. Considering this issue can be expected that apigenin is a proper drug for cancer treatment.

Keywords: Apigenin, Breast cancer, Interferon gamma, Interleukin-4

Citation: Ranjbar R, Dolatkhah M. **Evaluation of Immunochemotherapy Effects of Apigenin in Female Balb/c Mice with Breast Cancer.** J Isfahan Med Sch 2016; 33(358): 1891-7

1- Professor, Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2- PhD Student, Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Corresponding Author: Milad Dolatkhah MSc, Email: milad.dolatkhah@yahoo.com